

LEK. SIROV.	God. XXXIII	Broj 33	Str. 53 – 61	Beograd 2013.
LEK. SIROV.	Vol. XXXIII	No. 33	PP. 53 – 61	Belgrade 2013.

Originalni naučni rad – Original scientific paper

Rukopis primljen: 7.11.2013.

UDC: 582.933:543.42

Prihvaćen za publikovanje: 4.12.2013.

ODREĐIVANJE AUKUBINA PRIMENOM HPLC I HPTLC TEHNIKA U METANOLNIM EKSTRAKTIMA VRSTA *Veronica montana*, *Veronica beccabunga* I *Veronica polita*

Jelena Živković¹, Teodora Janković¹, Zoran Maksimović²

¹ Institut za proučavanje lekovitog bilja "dr Josif Pančić", Tadeuša Koščuška 1, 11000 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakognozu, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija.

IZVOD

U ovom radu, primenom spektrofotometrijskih metoda, određen je sadržaj ukupnih fenola, fenilpropanoida i iridoida u metanolnim ekstraktima herbi *Veronica montana*, *V. beccabunga* i *V. polita*. Rezultati spektrofotometrijske analize pokazuju da su iridoidni glukozidi dominantna grupa sekundarnih metabolita u odabranim vrstama. Njihov sadržaj bio je najveći u herbi *V. polita*, dok je *V. montana* bila najbogatija ukupnim fenolima i ukupnim fenilpropanoidima. Dodatno, u ispitivanim ekstraktima kvantifikovan je aukubin primenom tehnika visoko-efikasne tečne hromatografije (HPLC) i visoko-efikasne tankoslojne hromatografije (HPTLC). Sadržaj aukubina određen primenom HPLC tehnike kretao se od 5,66 u ekstraktu *V. beccabunga* do 69,96 mg/g suve mase u ekstraktu *V. polita*. Iz rezultata dobijenih u ovom radu uočava se da nema statistički značajnih razlika između vrednosti za sadržaj aukubina dobijenih primenom HPLC i HPTLC tehnika. Predložena HPTLC metoda kao jednostavnija, ekonomičnija, sa mogućnošću analize više uzoraka istovremeno, može biti pogodna za rutinsku identifikaciju i kvantifikaciju aukubina u *Veronica* vrstama, kao i sastavni deo protokola za procenu autentičnosti biljnog materijala.

Ključne reči: aukubin, *Veronica* spp., hromatografija.

UVOD

Prema poslednjoj klasifikaciji skrivenosemenica [1], rod *Veronica* sa oko 450 vrsta predstavlja najveći rod familije Plantaginaceae. Dosadašnja fitohemijska ispitivanja ovog roda ukazala su na prisustvo iridoidnih glukozida, feniletanoidnih i flavonoidnih glikozida [2-6]. Iridoidna jedinjenja karakteristična za ovaj rod su aukubin i katalpol, kao i estri katalopla sa derivatima cimetine (verminozid i minekozid) i benzojeve kiseline (veronikozid, katalpozid, verprozid, amfikozid). Grayer-Barkmeijer [7] je ukazala na njihov značaj u razjašnjavanju sistematike i evolucije roda *Veronica*.

Uloga iridoida u biljkama nije sasvim razjašnjena. Obzirom na veliku raznovrsnost ove grupe sekundarnih metabolita i činjenicu da se nalaze u tkivima sa intenzivnom metaboličkom aktivnošću, jasno je da se radi o jedinjenjima od velikog značaja za biljku. Sigurno je da zahvaljujući svom gorkom ukusu predstavljaju način odbrane biljaka od herbivora. Takođe, mnogi iridoidi služe kao prekursori drugih tipova jedinjenja [8].

Iridoidni glukozidi su i biološki aktivna jedinjenja. Do sada je poznato više različitih aktivnosti iridoida, kao što su: antimikrobna, antidijabetična, antiinflamatorna, antinociceptivna, antihiperlipidemijska, hepatoprotektivna, antitumorska i imunostimulatorna [9]. Pored toga, deluju i kao inhibitori osteoporoze, humane neutrofilne elastaze i melanogeneze. Za aukubin je pokazano da ispoljava antiinflamatornu aktivnost u testu karageninom indukovano edema kod miša, spazmolitičku aktivnost u testu acetilholinom indukovanih kontrakcija na uterusu pacova, citotoksičnu aktivnost na HeLa ćelijskoj liniji, kao i inhibiciju NF- κ B indukovane aktivacije mastocita [10-13].

Cilj ovog rada bio je određivanje sadržaja ukupnih fenola, iridoida i fenilpropanoida primenom spektrofotometrijskih metoda, kao i određivanje sadržaja aukubina u metanolnim ekstraktima herbi vrsta *Veronica montana* L., *Veronica beccabunga* L. i *Veronica polita* Fr. primenom HPLC i HPTLC tehnika.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

Biljni materijal korišćen za analizu predstavljaju nadzemni delovi u cvetu vrsta *Veronica montana* i *Veronica beccabunga* prikupljeni na planini Goč tokom 2010. godine, kao i nadzemni delovi u cvetu vrste *V. polita* prikupljeni u Pančevu tokom 2011. godine. Herbarski materijal je deponovan u Institutu za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić". Nakon sakupljanja, biljni materijal je osušen prirodnim putem na promajnom mestu i neposredno pre analize usitnjen je melevanjem.

Izrada ekstrakata

Sprašen biljni materijal ekstrahovan je metanolom u tamnim bocama tokom 48 h uz povremeno mućkanje. Odnos droge i ekstrakcionog sredstva iznosio je 1:20 (m/v). Nakon završene ekstrakcije, pod istim uslovima izvršena je i re-ekstrakcija. Dobijeni ekstrakti su spojeni, a rastvarač je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom. Ekstrakti su dodatno sušeni u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi, do konstantne mase.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima herbi odabranih *Veronica* vrsta određivan je spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom [14]. Ispitivani suvi ekstrakti (20 mg) su rastvoreni u metanolu (2 ml). Dve stotine µl rastvorenog ekstrakata je dodato u 1 ml razblaženog (1:10) FC reagensa. Nakon 4 min, dodato je 800 µl natrijum karbonata (75 g/l). Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 765 nm. Za kalibraciju standardne krive korišćena je galna kiselina (0-100 mg/l). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po gramu suvog ekstrakta. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

Određivanje sadržaja ukupnih fenilpropanoida

Sadržaj ukupnih fenilpropanoida u metanolnim ekstraktima odabranih *Veronica* vrsta određivan je spektrofotometrijskom metodom, po proceduri opisanoj u Evropskoj farmakopeji 6.0 za drogu *Ballotae nigrae herba* [15]. Ispitivani suvi ekstrakti su rastvoreni u metanolu. Dobijeni tečni ekstrakt prenet je u odmernu tikvicu od 100 ml i dopunjen je istim ekstrakcionim sredstvom. Jedan ml ovog osnovnog rastvora prenet je u odmernu tikvicu od 10 ml, dodata su 2 ml hlorovodonične kiseline (0.5 M) i 2 ml rastvora dobijenog rastvaranjem 10 g natrijum nitrita i 10 g natrijum molibdata u 100 ml vode. Potom je dodato i 2 ml rastvora natrijum hidroksida (2 M) i dopunjeno je vodom do crte. Slepna proba dobijena je prenošenjem 1 ml osnovnog ekstrakta u odmernu tikvicu od 10 ml i dodavanjem 2 ml hlorovodonične kiseline (0.5 M) a zatim i 2 ml rastvora natrijum hidroksida (2 M) nakon čega je rastvor dopunjen do crte. Apsorbancija uzorka merena je uz slepu probu na 525 nm. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja. Sadržaj fenilpropanoida izražen je kao sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline, prema formuli:

$$\% \text{akteozida} = (A \times 1000 / m \times 185),$$

gde je A – apsorbancija uzorka, a m – masa ekstrakta u gramima.

Određivanje sadržaja ukupnih iridoida

Sadržaj ukupnih iridoida u metanolnim ekstraktima herbi odabranih vrsta roda *Veronica* određivan je spektrofotometrijskom metodom, na bazi reakcije sa

Trim-Hill-ovim reagensom [16]. Suvi ekstrakti rastvoreni su u metanolu. Sto μl ovako dobijenog tečnog ekstrakta pomešano je sa 1 ml Trim-Hill reagensa (sirćetna kiselina: 0,2% bakar (II) sulfat: koncentrovana hlorovodonična kiselina, 10: 1: 0,5, v/v/v). Uzorak je grejan 5 minuta na 100° C. Ohlađenom rastvoru merena je apsorbanacija na 609 nm. Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je standard aukubina (0,1 – 1 mg/ml). Rezultati su izraženi kao ekvivalent aukubina po gramu suvog ekstrakta. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

Kvantitativna HPTLC analiza aukubina

Za HPTLC određivanje aukubina u metanolnim ekstraktima herbi odabranih *Veronica* vrsta po 40 mg suvog ekstrakta rastvoreno je u 2 ml metanola. Dobijeni ekstrakti su pre injektovanja filtrirani kroz 0,45 μm membranski filter. Za analizu je korišćena HPTLC silika gel 60F₂₅₄ staklena ploča. Ploča je razvijana u mobilnoj fazi etilacetat: mravlja kiselina: sirćetna kiselina: voda u odnosu 90:15:15:20 (v/v/v/v) u automatskoj komori koja je prethodno bila zasićena parama mobilne faze u trajanju 20 minuta uz primenu filter papira. Ekstrakti su naneti na ploču u zapremini 1-4 μl , dok je rastvor aukubina koncentracije 250 $\mu\text{g/ml}$ nanet u zapreminama 0,5-4 μl . Svi rastvori naneti su u vidu traka od 9 mm, na rastojanju od 8 mm od ivice ploče. Front mobilne faze iznosio je 80 mm.

Kvantitativna HPLC analiza aukubina

Za HPLC određivanje aukubina u metanolnim ekstraktima odabranih *Veronica* vrsta po 40 mg suvog ekstrakta rastvoreno je u 2 ml metanola. Dobijeni ekstrakti su pre injektovanja filtrirani kroz 0,45 μm membranski filter. Razdvajanje je vršeno na koloni Zorbax SB – C18 veličine čestica 5 μm i dimenzija 150 × 4,6 mm. Kao mobilna faza korišćena je 1% ortofosforna kiselina u vodi (faza A) i acetonitril (faza B). Injekciona zapremina uzorka je 5 μl , a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0-5 min, 2-10% B; 5-10 min, 10-15% B; 10-30 min, 15% B; 30-32 min, 15-18% B, 32-42 min, 18% B; 42-50 min, 18-25% B, 50-55 min, 25-40% B; 55-60 min, 40-70% B, 60-63 min, 70-100% B. Brzina protoka je 1 ml/min, a UV apsorbanacija je merena na 204 nm.

Statistička analiza

Podaci su obrađeni u programu Statgraphics Centurion, verzija XVI. Za procenu značajnosti razlike vrednosti aukubina dobijenih primenom HPLC i HPTLC tehnika korišćen je Studentov t-test. Nivo značajnosti bio je postavljen na 0,05.

REZULTATI I DISKUSIJA

Spektrofotometrijski testovi se najčešće koriste za primarnu karakterizaciju biljnih sirovina i njihovih ekstrakata. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, fenilpropanoida i iridoida u metanolnim ekstraktima odabranih *Veronica* vrsta prikazani su u Tabeli 1. Uočava se da su iridoidi dominantna grupa sekundarnih metabolita u ispitivanim ekstraktima. Njihov sadržaj bio je najveći u metanolnom ekstraktu herbe *V. polita*, a najniži u ekstraktu herbe *V. montana*. Kada su u pitanju druge grupe sekundarnih metabolita (fenoli i fenilpropanoidi), ekstrakt herbe *V. montana* je bio najbogatiji.

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola, ukupnih fenilpropanoida i ukupnih iridoida u ispitivanim metanolnim ekstraktima

Table 1. The content of total phenolics, total phenylpropanoids and total iridoids in the tested methanolic extracts.

Uzorak	Ukupni fenoli (mg GAE/g ekstrakta)	Ukupni iridoidi (mg aukubina/g ekstrakta)	Ukupni fenilpropanoidi (% akteozida)
<i>V. montana</i>	105,24 ± 3,22	247,43 ± 5,44	1,60 ± 0,08
<i>V. beccabunga</i>	96,29 ± 2,28	398,23 ± 7,45	1,39 ± 0,05
<i>V. polita</i>	80,34 ± 3,15	467,33 ± 9,41	1,01 ± 0,02

Među hemijskim metodama koje se koriste u ispitivanju lekovitog bilja, hromatografske tehnike imaju značajnu ulogu i uvedene su u sve savremene farmakopeje. Najčešće primenjivane hromatografske metode u fitohemijskoj analizi su tankoslojna hromatografija (TLC), visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC) i gasna hromatografija (GC) [17].

Aukubin je prisutan uglavnom u biljkama porodice Scrophulariaceae, Plantaginaceae i Rubiaceae, gde igra značajnu ulogu kao hemotaksonomski marker [8]. Njegovo prisustvo je takođe pokazano u brojnim *Veronica* vrstama [18]. Zbog aktivnosti aukubina pokazanih tokom poslednjih decenija, interes za biljkama bogatim ovim sekundarnim metabolitom raste.

U odnosu na sadržaj aukubina odabrane *Veronica* vrste do sada nisu analizirane. U ovom ispitivanju, sadržaj aukubina u njima je određivan HPLC metodom sa UV/VIS detekcijom uz primenu detektora na principu fotodioda. Njegova kvantifikacija vršena je preko površine pikova dobijenih integracijom sa odgovarajućih hromatograma uz primenu eksternog standarda. Retenciono vreme aukubina iznosi 5,42 minuta sa standardnom devijacijom od 0,01. Rezultati prikazani u Tabeli 2 pokazuju da svi ispitivani ekstrakti sadrže aukubin. Njegov sadržaj najveći je u ekstraktu nadzemnog dela *V. polita* (69,96 mg/g suvog

ekstrakta, što preračunato po gramu biljne sirovine iznosi 17,78 mg), dok je u ekstraktima druge dve ispitivane vrste približno jednak. Imajući u vidu da je vrsta *V. persica* korovska vrsta, ovakav rezultat može biti značajan jer je čini potencijalno atraktivnom sirovinom za farmaceutske i hemijske industrije.

U *Veronica* vrstama sadržaj aukubina je do sada kvantifikovan primenom LC/MS [18] i MECC-MS [19] metoda. Sadržaj aukubina određen primenom LC/MS tehnike je varirao od 0,69 do 12,80 mg/g suvog biljnog materijala, pri čemu je najniži sadržaj zabeležen upravo u vrsti *V. beccabunga* [19]. Sadržaj aukubina u vrstama *V. spicata*, *V. longifolia* i *V. chamaedrys* određen primenom MECC-MS tehnike iznosio od 4,00 do 24,00 mg/g suve biljne sirovine [19].

Visoko efikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) se zbog svoje ekonomičnosti, jednostavnosti izvođenja, mogućnosti testiranja više uzoraka istovremeno, kao i primene većeg broja rastvarača u sastavu mobilne faze, u poslednje vreme sve više koristi kao tehnika izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analizu aktivnih komponenta u biljnim uzorcima [20]. Zbog toga je u okviru ovog ispitivanja, pored HPLC metode primenjena i HPTLC metoda za kvantifikaciju aukubina u metanolnim ekstraktima herbi odabranih *Veronica* vrsta. Rezultati određivanja aukubina primenom HPTLC metode prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj aukubina u ispitivanim metanolnim ekstraktima određen primenom HPLC i HPTLC metode

Table 2. The content of aucubin in the investigated methanolic extracts, determined by HPLC and HPTLC methods.

Uzorak	Sadržaj aukubina (mg /100 g ekstrakta)	
	HPLC	HPTLC
<i>V. montana</i>	5,66 ± 0,31	6,76 ± 1,04
<i>V. beccabunga</i>	5,81 ± 1,39	5,76 ± 0,76
<i>V. polita</i>	69,96 ± 0,95	72,40 ± 1,89

Studentovim t-testom koji je korišćen za procenu statističke značajnosti razlike između sadržaja aukubina dobijenog primenom HPLC i HPTLC tehnika, pokazano je da su one ekvivalentne. Ekvivalentnost primenjenih HPLC i HPTLC tehnika koja je pokazana u okviru ovog ispitivanja i ranije je potvrđena u literaturi [21, 22].

Predložena HPTLC hromatografska metoda može biti pogodna za rutinsku identifikaciju i kvantifikaciju aukubina u *Veronica* vrstama, i može biti sastavni deo protokola za procenu autentičnosti biljnog materijala.

ZAKLJUČAK

Rezultati spektrofotometrijske analize pokazuju da su iridoidni glukozidi dominantna grupa sekundarnih metabolita u odabranim vrstama. Njihov sadržaj bio je najveći u herbi *V. polita*, dok je *V. montana* bila najbogatija ukupnim fenolima i ukupnim fenilpropanoidima. Dodatno, HPLC-DAD i HPTLC hromatografske metode razvijene su za kvantifikaciju biološki aktivnog iridoida aukubina u metanolnim ekstraktima vrsta *V. polita*, *V. montana* i *V. beccabunga*. Pokazano je da nema statistički značajnih razlika između vrednosti dobijenih pomenutim tehnikama.

LITERATURA

1. Angiosperm Phylogeny Group (2003): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II, *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 141, 399-436.
2. R. M. Taskova, C. H. Gottfredsen, S. R. Jensen (2006): Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae, *Phytochemistry*, vol. 67, 286-301.
3. R. M. Taskova, T. Kokubuna, R. J. Grayer, K. G. Ryan, P. J. Garnock-Jones (2008): Flavonoid profiles in the Heliohebe group of New Zealand *Veronica* (Plantaginaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 36, 110-116.
4. I. Saracoglu, M. Varel, S. Harput, A. Nagatsu (2004): Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinera*, *Phytochemistry*, vol. 65, 2379-2385.
5. D. C. Albach, R. J. Grayer, G. C. Kite, S. R. Jensen (2005): *Veronica*: Acylated flavone glycosides as chemosystematics markers, *Biochemical Systematic and Ecology*, vol. 33, 1167-1177.
6. S. R. Jensen, D. C. Albach, T. Ohno, R. J. Grayer (2005) *Veronica*: Iridoids and cornoside as chemosystematic markers, *Biochemical Systematic and Ecology*, vol. 33, 1031-1047.
7. R. Grayer-Barkmeijer (1973): A chemosystematic study of *Veronica*: Iridoid glucosides, *Biochemical Systematic and Ecology*, vol. 1, 101-110.
8. P. D. Marin (2003): Biohemijska i molekularna sistematika biljaka, NNK Internacional, Beograd
9. B. Dinda, S. Debnath, Y. Harigaya (2007): Naturally occurring iridoids. A Review, Part 1, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 52(2): 159-222.
10. E. Haznagy-Radnai, B. Rethy, S. Czige, I. Zupko, E. Weber, T. Martinek, G. Falkay, I. Mathe (2008): Cytotoxicactivities of Stachys species, *Fitoterapia*, vol. 79, 595-597.

11. H. J. Jeong, H. N. Koo, H. J. Na, M. S. Kim, S. H. Hong, J. W. Eom, K. S. Kim, T. Y. Shin, H. M. Kim (2002): Inhibition of TNF- α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF- κ B activation in RBL-2H3 mast cells, *Cytokine*, vol. 18, 252-259
12. A. V. Ortiz de Urbina, M. L. Martin, B. Fernandez, L. San Roman, L. Cubillo (1994): In vitro antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, aucubin, and catalpol, *Planta Medica*, Vol. 60, 512-515.
13. M. C. Recio, R. M. Giner, S. Manez, J. L. Rios (1993): Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents, *Planta Medica*, vol. 60, 232-234.
14. Y. S. Veliloglu, G. Mazza, L. Gao, B. D. Oomah (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 46, 4113-4117.
15. European Pharmacopoeia 6.0 (2008): Council of Europe, 1307-1308, Strasbourg Cedex, France.
16. A. R. Trimm, R. Hill (1952): The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides, *Biochemical Journal*, vol. 50, 310-319.
17. M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma (2011): In: High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis (eds. M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma) CRC Press, Boca Raton, Florida.
18. G. Crişan, L. Vlase, G. Balica, D. Muntean, C. Ştefănescu, R. Păltinean, M. Tămas, S. Leucuta (2010): LC/MS analysis of aucubin and catalpol of some Veronica species, *Farmacia*, vol. 58(2): 237-242.
19. J. Suomi, S. K. Wiedmer, M. Jussila, M.-L. Riekkola (2001): Determination of iridoid glycosides by micellar electrokinetic capillary chromatography-mass spectrometry with use of the partial filling technique, *Electrophoresis*, vol. 22, (12): 2580-2587.
20. M. M. Srivastava (2011): In: High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) (ed. M. M. Srivastava) Springer-Verlag, Berlin.
21. T. Janković, N. Menković, G. Zdunić, I. Beara, K. Balog, K. Šavikin, N. Mimica-Dukić (2010): Quantitative determination of aucubin in seven Plantago species using HPLC, HPTLC and LC-ESI-MS methods, *Analytical Letters*, vol. 43, 2487-2495.
22. M. Gunther, P. C. Schmidt (2005): Comparison between HPLC and HPTLC-densitometry for the determination of harpagoside from Harpagophytum procumbens CO₂-extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 37, 817-821.

**DETERMINATION OF AUCUBIN BY HPLC AND HPTLC METHODS IN
METHANOLIC EXTRACTS OF *Veronica montana*, *Veronica beccabunga*
AND *Veronica polita***

Jelena Živković¹, Teodora Janković², Zoran Maksimović³

¹ Institute for Medicinal Plant Research “Dr. Josif Pančić”, Tadeuša Košćuška 1, 11000
Belgrade, Republic of Serbia

² University of Belgrade, School of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 11000
Belgrade, Republic of Serbia.

SUMMARY

In the present study, methanolic extracts of three *Veronica* species, namely *Veronica montana*, *Veronica beccabunga* and *Veronica polita*, were analyzed for the total iridoids, total phenylethanoids and total phenolics contents. The results showed that iridoid glycosides are the major class of tested secondary metabolites in selected *Veronica* species. The highest iridoid content (467.33 mg/g d.w.) was recorded in extract of *V. polita*, while the richest source of total phenolics and total phenylethanoids was the extract of *V. montana* (105.24 mg GAE/g d.w. and 16.03 mg acteoside/g d.w., respectively). Additionally, aucubin determination in tested extracts was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and high-performance thin layer chromatography (HPTLC). The aucubin content in investigated samples determined by HPLC varied between 5.66 in extract of *V. beccabunga* and 69.96 mg/g d.w. in extract of *V. polita*. No significant differences were observed between the aucubin content in plant extracts obtained by HPLC and HPTLC techniques. The proposed HPTLC method is simple, rapid and more economical as compared to HPLC method, and thus it may be suitable for routine identification and quantification of aucubin in *Veronica* species.

Key words: aucubin, *Veronica* spp., chromatography.